

Associação de genes HLA e não HLA com a suscetibilidade para a sarcoidose na população portuguesa do norte

Helena Alves¹, Bruno Lima², António Morais³

m.helena.alves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade da Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis. Centro de Saúde Pública Doutor Goncalves Ferreira. Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

(2) Oficina de BioEstatística, Vilar Formoso.

(3) Serviço de Pneumologia. Centro Hospitalar de São João, Porto; Faculdade de Medicina. Universidade do Porto.

Introdução

A sarcoidose é uma doença granulomatosa multi-sistémica de origem desconhecida caracterizada por uma inflamação granulomatosa nos órgãos afectados, sobretudo nos pulmões e gânglios linfáticos (1, 2, 3). Pode classificar-se como uma doença poligénica, multifatorial, para a patogénese da qual concorrem fatores ambientais em interação com múltiplos genes. As diferentes formas de apresentação clínica, casos de agregação familiar e diferentes incidências geográficas e raciais, suportam o papel determinante dos fatores genéticos (4).

Patogénese da sarcoidose

A opinião corrente aceite é a de que a patogénese da sarcoidose envolve uma sucessão de reações imunológicas que leva à formação dos granulomas e que envolvem a internalização de um ou mais antígenos estranhos, o seu processamento e apresentação pelas células dendríticas ou macrófagos, envolvendo o complexo major de Histocompatibilidade (MHC), péptido e o recetor da célula T (TCR). Posteriormente, o desenvolvimento das células T efectoras específicas e a ativação dos macrófagos levará à indução da formação dos granulomas (5).

A resposta inflamatória iniciada com os linfócitos T CD4+ e ativação do TCR potencia a libertação de citocinas pelos macrófagos e células T Helper tipo 1.

A libertação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), do interferon gama (IFN γ), da interleucina 2 (IL-2), e de fatores de crescimento, resulta no desenvolvimento de granulomas não caseosos (6, 7, 8).

A resolução da inflamação, a sua persistência ou a fibrose dependem de um equilíbrio delicado que envolve as células inflamatórias, as células reguladoras, a apoptose e as respostas TH1/TH2 às citocinas, sendo que a resolução da inflamação depende do equilíbrio no tecido, entre as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ) e as reguladoras IL-10 e *Transforming Growth Factor Beta* (TGF-Beta) (9).

O substrato imunológico necessário para a ocorrência da inflamação granulomatosa está ainda por esclarecer e a heterogeneidade da doença indicia múltiplos fatores concorrentes, onde a infeção viral prévia ou a resposta imunológica a um transplante pulmonar ou de medula óssea, convivem em observações clínicas de inflamação *sarcoid-like*.

Este polimorfismo na ocorrência das manifestações da doença demonstra interações complexas entre fatores genéticos vários, envolvendo citocinas, expressão e apresentação antigénica, células imunes, mediadores químicos de inflamação e apoptose (9).

Genética da sarcoidose

Em consequência das evidências do componente genético e imunológico e das reações inflamatórias envolvidas na patogénese da sarcoidose, os genes que codificam a apresentação e reconhecimento antigénico, os antígenos leucocitários humanos (HLA) e os genes das citocinas e seus recetores têm sido estudados ao longo dos anos. Muitos deles foram confirmados pelos scans do genoma e *genome wide association studies* (GWAS) efetuados nos últimos anos. Foram ainda identificados outros genes candidatos, aparentemente sem função imune, cujos polimorfismos podem influenciar o desenvolvimento ou evolução da doença.

HLA

A associação mais forte e mais consistente é a associação com os antígenos HLA classe II, descrita como estando ligada quer à susceptibilidade para a doença, quer à sua expressão fenotípica (10-12).

Sendo o MHC uma das zonas do genoma com maior densidade de genes e com maior desequilíbrio de ligação, algumas das associações encontradas nesta e noutras doenças podem ser devidas não aos genes que codificam os antígenos leucocitários humanos, mas a outros na sua proximidade e em desequilíbrio de ligação com os *loci* HLA (13).

BTNL2

Um dos genes descritos como associado à suscetibilidade para a sarcoidose em diferentes populações e com diferentes fenótipos, localizado no MHC, entre as regiões HLA-classe II e Classe III, é o gene *BTNL2* (butyrophilinlike 2) (14-16). As moléculas BTNL são estruturalmente homólogas a moléculas co-estimulatórias expressas nas células apresentadoras do antigénio (APCs), críticas para a resposta imune efetora.

A expressão da molécula *BTNL2* nas células dendríticas (baço e nódulos linfáticos) e nas células B periféricas, suportam o papel que se lhe atribui na modulação da função das APCs (16). A molécula *BTNL2* inibe a proliferação das células T, a produção de IL-2 e a produção de citocinas pro-inflamatórias em culturas de células T. A mutação observada (G > A) no SNP rs2076530 resulta numa proteína truncada que afetará a sua localização e função na membrana celular.

Embora não estejam completamente conhecidas as implicações da mutação deste gene, é espectável que uma expressão de membrana alterada de uma molécula indutora de um sinal negativo para os linfócitos T possa ter como consequência um estado de hiperativação descontrolada destas células, que é uma das características patológicas na sarcoidose (1).

Para além de ter sido descrito como um potencial fator de risco para a sarcoidose a associação do alelo A do SNP rs2076530 com a cronidade também tem sido reportada.

Annexin A11

No cromossoma 10q22.3 foi entretanto identificado outro gene, Annexin A11, com um polimorfismo fortemente associado à sarcoidose (SNP rs1049550 C/T). Uma diminuição ou disfunção da anexina A11 pode afetar a via da apoptose e induzir um desequilíbrio entre a apoptose e a sobrevivência das células inflamatórias ativadas.

Estudos recentes em populações com origem na Alemanha, República Checa e América demonstraram uma forte associação da doença com o SNP (rs1049550 C/T) no gene Annexina A11 (*ANXA11*), localizado no Cromossoma 10q22.3 (17-19).

Esta variante funcional denominada *ANXA11* R230C, tem sido apontada como um marcador de proteção e modificador da doença na sarcoidose (18).

A mutação está localizada no exão 6 e resulta numa substituição de uma Citosina com uma Timidina (C/T), que altera o codão de uma arginina básica para uma cisteína polar no resíduo 230 (R230) (20, 21).

_Estudos no norte de Portugal

Em Portugal, na zona norte, foram efetuados 3 estudos, em doentes com sarcoidose oriundos da consulta de Pneumologia do Hospital de S. João do Porto (11, 16, 22).

Polimorfismos HLA e TNF-alfa

O primeiro estudo foi publicado em 2008, incluiu 104 doentes com sarcoidose e nele foram estudados os polimorfismos dos alelos HLA classe I e classe II e do TNF-alfa (11).

Foi realizada a tipagem HLA- A*, -B*, -C*, DRB1*, DQB1* e TNF-alfa por métodos de biologia molecular. O DNA foi extraído do sangue periférico e as tipagens foram feitas por métodos de PCR-SSP e de PCR-hibridização reversa. As frequências alélicas foram comparadas com controlos saudáveis da mesma região.

Foram encontradas frequências aumentadas do HLA-B*08 (10,6% vs. 6,1%), O.R.=1.8 e p=0.02, e do HLA-DRB1*12 (4,3% vs. 1,7%), O.R.=2.63 e p=0.03. Os doentes com eritema nodoso tinham frequências aumentadas dos alelos HLA-DRB1*03 (28% vs. 9,3%), R.R.=2.39, e pc=0.01 e do HLA-DQB1*02 (38% vs. 18%), R.R.=2.1 e pc=0.02.

O alelo HLA-DQB1*03 estava diminuído nos doentes com padrão obstrutivo R.R.=0.53 e pc=0.05.

O alelo HLA-DRB1*15 estava relacionado com o padrão restritivo e reduzida capacidade de difusão (21,1% vs. 6,6%), R.R.=2.46 e p=0.01 e (18,1% vs. 3,8%), R.R.=1.87 e pc= 0.05 respetivamente. O genótipo TNF-alfa A/A (*high*) estava significativamente associado com o eritema nodoso (p=0.04).

Este artigo concluiu que também nestes doentes foram encontradas evidências que suportam a associação genética do HLA classe I e classe II com a suscetibilidade para a sarcoidose, o seu tipo de apresentação, a sua gravidade e evolução.

Também para o TNF-alfa, e de acordo com o previamente descrito em outras publicações, o genótipo TNF-alfa A/A (*high*) tinha uma associação significativa com o eritema nodoso.

BTNL2

Foi efetuado um estudo caso-controlo de 151 doentes e 150 controlos da zona norte (*Quadro 1*), para estudo das frequências alélicas do SNP *BTNL2* rs2076530 G/A e avaliação da associação dos polimorfismos deste SNP com a suscetibilidade para a sarcoidose e a evolução da doença.

As frequências alélicas do *BTNL2* rs206530 A estavam significativamente aumentadas na sarcoidose sem desequilíbrio de ligação com os alelos HLA-DRB1, exceto no subgrupo de doentes com o Síndrome de Löfgren, onde o alelo determinante era o HLA-DRB1*03.

Verificou-se ainda que o alelo A estava também aumentado nos doentes com doença torácica isolada embora não houvesse diferença no estadiamento radiológico nem na evolução da doença.

Por seu lado, o alelo HLA-DRB1*03, para além da associação com o Síndrome de Löfgren estava significativamente relacionado com a resolução da doença.

Este estudo confirmou na população portuguesa a associação do alelo A do SNP *BTNL2* rs2076530 com a suscetibilidade para a sarcoidose, encontrando ainda fatores de risco genéticos independentes em diferentes fenótipos clínicos da doença (com e sem Síndrome de Löfgren, doença torácica isolada e a associação HLA-DRB1*03 com a resolução da doença).

ANXA11

O polimorfismo da Anexina A11 foi estudado em 208 doentes e 197 controlos saudáveis (22) (Quadro 1). Todos os doentes tinham sarcoidose torácica clinicamente, com confirmação radiológica e testes de função pulmonar.

A presença de granulomas não caseosos de células epitelioides foi determinada em biópsias em 69% dos casos. Todos os indivíduos sem confirmação histológica preenchiam os critérios internacionais da *European Respiratory Society* (ERS), a *American Thoracic Soci-*

ety (ATS) e a *World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases* (WASOG).

O Síndrome de Löfgren foi definido como a presença de linfadenopatia hilar bilateral, febre, artralgia do tornozelo e eritema nodoso. A genotipagem do SNP rs1049550 efetuada em DNA genómico por sequenciação revelou uma frequência do alelo T significativamente mais baixa nos doentes com sarcoidose (33,2%) do que nos controlos (44,9%) ($p < 0.001$) e o genótipo CC era significativamente mais frequente nos doentes (47,6% vs 31,0%, $p = 0.001$).

Não foram encontradas diferenças significativas na frequência deste alelo entre os doentes com e sem Síndrome de Löfgren. No entanto, a comparação destes subgrupos com os controlos revelou, que só havia uma significativa diminuição da frequência do alelo T no subgrupo dos que não tinham Síndrome de Löfgren.

Não foi encontrada associação significativa entre a presença do alelo T e a progressão da doença para a resolução ou cronicidade à semelhança de outros autores.

Este estudo confirmou a forte associação descrita anteriormente bem como o efeito protector do alelo T do SNP da anexina A11 rs1049550 C/T na susceptibilidade para a sarcoidose numa população caucasiana portuguesa.

A Anexina A11 é segregada pelos neutrófilos ativados e estão referidas alterações da sua expressão citoplasmática durante a fagocitose, pelo que é espectável que a *ANXA11* interfira com a função dos neutrófilos para além de regular a apoptose, podendo afetar a inflamação intersticial e a granulomatosa.

Quadro 1: Estudos efetuados na população do norte de Portugal para os genes *ANXA11* e *BTNL2*.

Autores	Gene	Alelo	Tamanho da amostra		OR	95% CI	p-value
			Sarcoidose	Controlos			
Morais A et al 2013 (22)	<i>ANXA11</i>	rs1049550 C	278 (66,8%)	217 (55,1%)	1		
	<i>ANXA11</i>	rs1049550 T	138 (33,2%)	177 (44,9%)	0.61	0,45-0,82	<0.001
	<i>ANXA11</i>	Genótipo CC	99 (47,6%)	61 (31,0%)	1		0.001
Nº indivíduos (n)			208	197			
Totais alelos (2n)			416	394			
Morais A et al 2012 (16)	<i>BTNL2</i>	rs2076530 A	197 (65,2%)	167 (55,7%)	1.49	1,06 -2,10	0.01
	<i>BTNL2</i>	rs2076530 G	105 (34,8%)	133 (44,3%)	0.67	0,48 -0,94	0.01
Nº indivíduos (n)			151	150			
Totais alelos (2n)			302	300			

Meta-análise

Numa meta-análise entretanto apresentada pelos mesmos autores, com um total de 6 estudos, que incluem 3297 casos de sarcoidose e 3346 controlos saudáveis (*Quadro 2*), verificou-se que o alelo ANXA11 T era menos frequente no grupo de doentes com sarcoidose do que no grupo controlo, com um valor de $p < 0.001$, o qual mostra uma associação protectora deste alelo com a sarcoidose (23, 24, 25).

Consideram assim que esta meta-análise indica que há evidência suficiente para demonstrar uma associação conclusiva entre o ANXA11 SNP rs1049550 e a susceptibilidade para a sarcoidose.

Quadro 2: Resumo dos estudos de associação da sarcoidose com o SNP rs1049550 C/T do gene ANXA11.

Estudo	País	Tamanho da amostra (n)	
		sarcoidose	controlos
Hofmann <i>et al</i> 2008 ⁽¹⁷⁾	Alemanha	1636	1811
Li <i>et al</i> 2010 ⁽²⁴⁾	Alemanha	349	313
Mrazek <i>et al</i> 2011 ⁽¹⁸⁾	República Checa	245	254
Morais <i>et al</i> 2013 ⁽²²⁾	Portugal	208	197
Levin <i>et al</i> 2013 ⁽¹⁹⁾	USA	447	353
Zhang <i>et al</i> 2014 ⁽²⁵⁾	China	412	418

Referências bibliográficas:

- (1) American Thoracic Society, European Respiratory Society, World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Statement on sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(2): 736-55. Adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, Feb 1999. [LINK](#)
- (2) Spagnolo P, Luppi F, Roversi P, et al. Sarcoidosis: challenging diagnostic aspects of an old disease. Am J Med. 2012;125(2):118-25.
- (3) Soler P, Basset F. Morphology and distribution of the cells of a sarcoid granuloma: ultrastructural study of serial sections. Ann N Y Acad Sci. 1976;278:147-60.
- (4) Grunewald J. Review: role of genetics in susceptibility and outcome of sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med 2010; 31: 380-9.
- (5) Zissel G, Prasse A, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis-immunopathogenetic concepts. Semin Respir Crit Care Med. 2007;28(1):3-14. Review.
- (6) Paone G, Lucantoni G, Leone A, et al. Human neutrophil peptides stimulate tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. Chest. 2009;135(2):586-7.
- (7) Agostini C, Trentin L, Facco M, et al. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. J Immunol. 1996;157(2):910-8.

- (8) Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. J Clin Invest. 1985;75(5):1488-95. [LINK](#)
- (9) Noor A, Knox KS. Immunopathogenesis of sarcoidosis. Clin Dermatol. 2007;25(3):250-8.
- (10) Grunewald J, Brynedal B, Darlington P, et al. Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients. Respir Res. 2010; 11: 25. doi: 10.1186/1465-9921-11-25. [LINK](#)
- (11) Morais A, Alves H, Lima B, et al. HLA class I and II and TNFalpha gene polymorphisms in sarcoidosis patients. Rev Port Pneumol. 2008;14(6): 727-46.
- (12) Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans. Proc Am Thorac Soc. 2007;4(1):108-16. Review. [LINK](#)
- (13) Grunewald J. Genetics of sarcoidosis. Curr Opin Pulm Med. 2008;14(5): 434-9.
- (14) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. Nat Genet. 2005;37(4):357-64.
- (15) Spagnolo P, Sato H, Grutters JC, et al. Analysis of BTNL2 genetic polymorphisms in British and Dutch patients with sarcoidosis. Tissue Antigens. 2007; 70(3):219-27.
- (16) Morais A, Lima B, Peixoto MJ, et al. BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. Respir Med. 2012;106(12):1771-7.
- (17) Hofmann S, Franke A, Fischer A, et al. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. Nat Genet. 2008; 40(9):1103-6.
- (18) Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, et al. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. Genes Immun. 2011; 12(6):490-4.
- (19) Levin AM, Iannuzzi MC, Montgomery CG, et al. Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. Genes Immun. 2013;14(1): 13-8. [LINK](#)
- (20) Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, et al. CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. J Biol Chem. 1992; 267(19):13498-504. [LINK](#)
- (21) Fatimathas L, Moss SE. Characterisation of the sarcoidosis associated variant of annexin A11. Gen Physiol Biophys. 2009;28 Spec No Focus:F29-38. [LINK](#)
- (22) Morais A, Lima B, Peixoto M, et al. Annexin A11 gene polymorphism (R230C variant) and sarcoidosis in a Portuguese population. Tissue Antigens. 2013; 82(3):186-91.
- (23) Bruno A, Lima, António Morais, Helena Alves. ANXA11 Association with sarcoidosis susceptibility: a meta-analysis of non-family-based studies. Tissue Antigens. 2014;84:110-1. Poster/abstract [LINK](#)
- (24) Li Y, Pabst S, Kubisch C, et al. First independent replication study confirms the strong genetic association of ANXA11 with sarcoidosis. Thorax. 2010;65(10):939-40. [LINK](#)
- (25) Zhang LG, Xiao ZJ, Shi GC, et al. ANXA11 gene polymorphisms are associated with sarcoidosis in han chinese. BMJ Open. 2014. [In press]